

УДК 577.125.8

ВЛИЯНИЕ ГЕЛЬМИНТИЙ ИНВАЗИИ НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН БОКОПЛАВОВ БЕЛОГО МОРЯ

© Н. П. Ткач,¹ Р. У. Высоцкая,² Е. С. Керц³

^{1, 3} Карельский государственный педагогический университет,
ул. Пушкинская, 17, Петрозаводск, Республика Карелия, 185035

² Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, 185910

¹ E-mail: ntkatch@yandex.ru

Поступила 03.12.2007

Проведено сравнительное изучение показателей липидного обмена у беломорских амфипод (Gammaridae), инвазированных гельминтами: *Podocotyle atomon* (Trematoda), *Levinseniella propinqua* (Trematoda) и *Hymenolepis microstoma* (Cestoda) в разные сезоны года. Показано, что повышение зараженности индуцировало усиление защитных реакций организма, что проявилось в изменении содержания основных мембранных липидов и росте активности мембраносвязанных ферментов, таких как цитохром P-450. С осени у рачков отмечено повышение содержания фосфатидилхолина и соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин. Обсуждаются участие фосфатидилхолина в изменении жидкокристаллического состояния мембран и его роль в качестве эффектора пероксидазной активности цитохрома P-450 у зараженных гельминтами бокоплавов.

Ключевые слова: ракообразные, гельминты, обмен липидов.

Паразиты представляют существенный компонент любого биоценоза и оказывают немаловажное влияние на динамику численности отдельных свободноживущих видов, на характер взаимоотношений между компонентами всего сообщества через среду I порядка (их хозяев). В литоральном комплексе животных Кандалакшского залива удельный вес «паразитарного слагаемого» велик. В частности, у массовых беспозвоночных осушной зоны заражение существует постоянно, хотя встречаемость паразитов в поселениях того или иного хозяина может сильно варьировать в разные сезоны года (Зеликман, 1958). Во многих работах было показано, что при паразитарной инвазии происходят изменения липидного обмена у эктотермных организмов (Сидоров и др., 1989; Аракелова и др., 2004; Рипатти и др., 2005, и др.). В настоящее время работы по изучению влияния паразитарной инвазии на липидный статус ракообразных немногочисленны, между тем такого рода исследования чрезвычайно важны, поскольку гаммарусы составляют значительную часть рациона рыб в природных условиях и весь-

ма перспективны в качестве «живого корма» для молоди лососевых рыб, выращиваемых в рыбоводных хозяйствах. Целью работы было изучение влияния зараженности гельминтами на липидный обмен амфипод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 2 вида амфипод — *Gammarus oceanicus* (Segestrale, 1947) и *Gammarus duebeni* (Lilljeborg, 1851), собранные летом и осенью 2005—2006 гг. в литоральной зоне губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря. Исследование паразитов осуществлялось по общепринятому методу (Быховская-Павловская, 1985). Исследуемые рачки были заражены несколькими видами гельминтов (табл. 1). Как правило, осенью наблюдалась более высокая интенсивность инвазии.

Podocotyle atomon (Rudolphi, 1802) (Trematoda) является одним из самых массовых сосальщиков беломорских рыб. Это амфибореальный вид, имеющий широкий круг хозяев. В Кандалакшском заливе этот гельминт встречается преимущественно у рыб, постоянно или сезонно связанных с побережьем. В качестве первого промежуточного хозяина *P. atomon* выступают моллюски литторины. Вторым промежуточным хозяином служат бокоплавы. Первым промежуточным хозяином *Levinseniella propinqua* (Jägerskiöld, 1907) (Trematoda) являются брюхоногие моллюски, вторым — чаще всего ракообразные, реже рыбы или амфибии. Заканчивает развитие *L. propinqua* в морских птицах (Зеликман, 1958). Промежуточными хозяевами *Hymenolepis microstoma* (Creplin, 1829) (Cestoda) являются бентосные ракообразные, а основными — некоторые виды морских птиц (Успенская, 1963).

Собранных рачков одного вида измельчали, фиксировали (90%-ным (об.) этанолом) и хранили при температуре около 4 °С. Экстракцию липидов из зафиксированных тканей проводили по методу Фолча (Folch et al., 1957). Разделение липидных фракций проводили в системе растворителей петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90 : 10 : 1) на пластинках «Силуфол». Количественное определение холестерина прово-

Таблица 1

Показатели зараженности литоральных амфипод губы Чупа (Белое море) в летний и осенний периоды

Table 1. Parameters of invasion of the littoral Amphipods in the Chupa Inlet (the White Sea) in the summer and autumn periods

Виды	Сезон сбора	Количество просмотренных особей (экз.)	Экстенсивность (%) / интенсивность (минимальное—максимальное количество экз.)		
			<i>Podocotyle atomon</i>	<i>Levinseniella propinqua</i>	<i>Hymenolepis microstoma</i>
<i>G. oceanicus</i>	Лето	161	66.5/1—7	13.0/1—3	13.0/1—3
	Осень	344	49.4/1—91	27.3/1—31	50.9/1—58
<i>G. duebeni</i>	Лето	27	99.9/1—∞	2/1—3	35.0/1—3
	Осень	30	80.0/2—24	—	—

дили по реакции с цветным реагентом (Engelbrecht et al., 1974), остальных фракций — гидроксаматным методом (Сидоров и др., 1972).

Фосфолипидный состав определяли при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии на стальной колонке (250×4 мм), заполненной нуклеосилом 100-7, С-18. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил—метанол—гексан—85%-ная фосфорная кислота (918:30:30:17.5 (об.)). Обнаружение фосфолипидных фракций проводили по поглощению в УФ свете ($\lambda = 206$ нм) (Arduini et al., 1996) и идентифицировали их сравнением времени удерживания стандартных образцов. Анилингидроксилазную активность тканей амфипод определяли по методу Мазела (Mazel, 1972). Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию U Вилкоксона—Манна—Уитни при $p \leq 0.05$ (Гублер, Генкин, 1969).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования липидного состава литоральных бокоплавов показали, что осенью по сравнению с летними пробами уровень общих липидов снижался у *G. duebeni* с 17 до 8 % от сухой массы пробы (на 52 %) и у *G. oceanicus* с 11 до 10 % (на 8 %).

У *G. oceanicus* и у *G. duebeni* осенью повышалось общее количество фосфолипидов, соответственно на 14 и 92 %, и снижалось содержание эфиров холестерина на 7 и 74 % (табл. 2). Осенью уровень холестерина и триацилглицеринов был ниже у *G. oceanicus* (соответственно на 16 и 29 %) и выше у *G. duebeni* (на 80 и 3 %). Значения активности цитохрома Р-450 — фермента, принимающего участие в метаболизме холестерина, были выше у *G. oceanicus* по сравнению с *G. duebeni* и составляли соответственно 0.0028 ± 0.0011 и 0.0018 ± 0.0006 мкг парааминофенола/1 г сырого веса ткани / мин.

В фосфолипидном составе у исследуемых видов были выявлены сезонные изменения содержания основных фракций (табл. 3). Так, наблюдалось увеличение уровня фосфатидилхолина у *G. oceanicus* на 22 % и снижение содержания этого фосфолипида у *G. duebeni* на 29 %. У исследуемых рачков содержание лизофосфатидилхолина осенью повышалось в 2 раза у *G. oceanicus* и на 6 % у *G. duebeni*. Количество фосфатидилэтаноламина в осенних пробах было ниже по сравнению с летними значениями у *G. oceanicus* в 2 раза, а у *G. duebeni*, напротив, выше в 3 раза.

Таблица 2

Содержание липидных фракций у амфипод (% от массы общих липидов)

Table 2. The contents of lipid fractions at amphipods (% from total lipid content)

Виды	Сезон сбора	Фосфолипиды	Холестерин	Триацил-глицерины	Эфиры холестерина
<i>G. oceanicus</i>	Лето	50.2 ± 6.2	1.9 ± 0.5	13.1 ± 5.0	34.7 ± 9.7
	Осень	57.0 ± 7.2	1.6 ± 0.4	9.3 ± 1.3	32.2 ± 7.6
<i>G. duebeni</i>	Лето	38.1 ± 13.9	1.0 ± 0.5	11.9 ± 4.2	49.1 ± 11.6
	Осень	73.1 ± 6.8	1.8 ± 0.3	12.3 ± 3.5	12.8 ± 8.6

Таблица 3

Фосфолипидный состав общих липидов у амфипод (% от суммы всех фосфолипидов)

Table 3. Phospholipid composition of total lipids at amphipods
(% from the sum of total phospholipid)

Фосфолипиды	<i>G. oceanicus</i>		<i>G. duebeni</i>	
	Лето	Осень	Лето	Осень
Фосфатидилинозитол	15.4 ± 1.7	1.4 ± 0.3*	6.7 ± 0.9	2.5 ± 1.3
Фосфатидилсерин	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Фосфатидилэтанолламин	24.5 ± 3.2	11.6 ± 0.9*	9.0 ± 0.9	28.2 ± 21.6
Фосфатидилхолин	39.5 ± 2.5	48.3 ± 1.9*	49.7 ± 1.9	35.5 ± 8.0
Лизофосфатидилхолин	15.3 ± 2.9	34.5 ± 2.5*	30.6 ± 2.7	32.3 ± 14.8
Сфингомиелин	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3
Сумма неидентифицированных компонентов	3.1 ± 0.5	1.5 ± 0.6	1.0 ± 1.0	0.4 ± 0.4

Примечание. * — различия достоверны ($p \leq 0.05$) при сравнении летних и осенних проб *G. oceanicus*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В месте внедрения или локализации паразита возникает воспалительный процесс, одним из этапов которого у беспозвоночных является образование фиброзно-лейкоцитарной капсулы (Юрлова и др., 2000). В процессе инкапсуляции трансплантатов под действием лизосомальных гидролаз происходят изменение его поверхности и инициация синтеза фиброзных волокон (Jourdane, Cheng, 1987). Активация этих ферментов приводит к деградации тканей хозяина, о чем свидетельствует повышенный уровень лизофосфатидилхолина у *G. oceanicus* в осенний период. Увеличение количества лизофосфолипидов может происходить под влиянием фосфолипазы A_2 (Лизенко, Загорских, 1991), активность которой возрастает при воспалительных реакциях (Ступин, 2005). При протеинкиназе С-зависимом пути активации этой фосфолипазы основным источником биологически активных эйкозаноидов служит фосфатидилхолин, а точнее содержащиеся в нем арахидоновая (20:4 ω 6) и эйкозапентаеновая (20:5 ω 3) кислоты (Коломийцева и др., 2003). По нашим данным (Ткач и др., 2007), суммарное содержание 20:4 ω 6 и 20:5 ω 3 кислот составило в сезоны сбора у *G. oceanicus* 12—14 % от суммы жирных кислот, у *G. duebeni* 7—9 %. Полученные результаты позволяют предположить, что у *G. oceanicus* происходит интенсивный синтез фосфатидилхолина для использования его в качестве предшественника эйкозаноидов, принимающих активное участие в иммунном ответе при инвазии гельминтами.

По данным ряда авторов (Ataev, Coustau, 1999; Adema et al., 2000; Conpors, 2003), клеточные реакции эктотермных организмов играют главную роль в защитных реакциях на заражение трематодами. В осенних пробах была обнаружена активность цитохрома P-450, имеющего пероксидазную активность, что может являться частью реакций клеточного иммунитета. Между внутренней поверхностью фиброзно-лейкоцитарной капсулы беспозвоночного и телом паразита сохраняется узкий просвет, где накаплива-

ются цитотоксические факторы (Атаев, Полевщиков, 2004), в качестве которых могут выступать ферментативные, например пероксидазные, каскады (Connors et al., 1991).

В регуляции клеточного метаболизма принимают участие биологические мембраны через управление функционированием мембраносвязанных ферментов. На активность этих ферментов могут оказывать влияние вязкость липидного бислоя и концентрация липида — специфического фактора определенного фермента (Бурлакова, 1981). Показателем вязкости липидного компонента биомембран является отношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин. Значения этого соотношения составляли у *G. oceanicus* летом — 1.6, осенью — 4.2 и у *G. duebeni* соответственно 5.5 и 1.3. Кроме того, в опытах *in vitro* было выявлено, что для микросомальных оксидаз со смешанной функцией, например цитохрома Р-450, фактором служит фосфатидилхолин (Бурлакова, 1981). Полученные данные по вариации отношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин и содержания фосфатидилхолина могут служить указанием на изменения в рачках, направленных на активацию мембраносвязанных ферментов, принимающих участие в иммунных реакциях при паразитарной инвазии.

Показателем физиологического состояния гидробионтов бореальных вод может служить значение содержания общих липидов (Шатуновский, 1970), и в частности уровень резервных веществ. Снижение количества общих липидов и эфиров холестерина (основного запасного липида у исследуемых амфипод) обусловлено, по-видимому, интенсивным использованием липидов рачками в качестве структурных компонентов и источника энергии, так как известно, что гельминты потребляют существенную часть резервов хозяев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследования показали наличие изменений содержания липидных фракций у гаммарусов под влиянием паразитарной инвазии. Вследствие включения реакций клеточного иммунитета происходит усиление синтеза фосфатидилхолина, активности цитохрома Р-450 и фосфолипазы А₂, что ведет к возрастанию уровня лизофосфолипидов. Воздействие паразита на хозяина проявляется в существенном снижении запасных веществ (общих липидов и эфиров холестерина).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-4310.2006.4, РФФИ (№ 02.444.11.7135) и проекта РГНФ (проект № 05-04-97517).

Список литературы

- Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. 2004. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции. Паразитология. 38 (4): 342—351.
Аракелова Е. С., Чеботарева М. А., Забелинский С. А. 2004. О совместном влиянии природных температур и трематод на жирнокислотный состав липидов у Lit-

- torina saxatilis* (Olivi, 1792) (Gastropoda, Prosobranchia). Журн. общ. биол. 65 (3): 266—272.
- Бурлакова Е. Б. 1981. Роль липидов в процессе передачи информации в клетке. В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука. 23—33.
- Быховская-Павловская И. Е. 1985. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука. 121 с.
- Гублер Е. В., Генкин А. А. 1969. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина. 29 с.
- Зеликман Э. А. 1958. Некоторые эколого-паразитологические связи на литорали северной части Кандакшского залива. В кн.: Паразитофауна и окружающая среда. Некоторые вопросы экологии паразитов морских рыб. Сер. Основные проблемы паразитологии рыб. Л.: ЛГУ. 7—77.
- Коломийцева И. К., Перепелкина Н. И., Патрушев И. В., Попов В. И. 2003. Роль липидов в сборке эндоплазматического ретикула и диктиосом нейрональных клеток коры головного мозга якутского суслика при гибернации. Биохимия. 68 (7): 954—967.
- Лизенко Е. И., Загорских О. М. 1991. Сравнительная характеристика липидного состава органов енисейского и каспийского осетров. В кн.: Биологические ресурсы водоемов бассейна Балтийского моря. Петрозаводск: КНЦ РАН. 159—161.
- Рипатти П. О., Евсеева Н. В., Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Маркова Л. В. 2005. Липиды мышц и паразитарная инвазия микроспоридией (*Pleistophora vermiformis*) подкаменщика обыкновенного (*Gottus gobio*). В кн.: Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 165—171.
- Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Смирнов Л. П., Гурьянова С. Д. 1989. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука. 152 с.
- Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. 1972. Липиды рыб. I. Методы анализа. В кн.: Лососевые *Salmonidae* Карелии. Петрозаводск: КНЦ. 152—163.
- Ступин А. В. 2005. Эйкозаноиды и полиненасыщенные жирные кислоты при хронических воспалительных дерматозах. *Pacific Medical Journ.* 1: 88—90.
- Ткач Н. П., Высоцкая Р. У., Брызгин В. Ф. 2007. Сезонные изменения жирнокислотного состава у литоральных гаммарид (*Crustacea, Amphipoda*). Современные проблемы науки и образования. 5: 18—24.
- Успенская А. В. 1963. Паразитофауна бентических ракообразных Баренцева моря. М.; Л.: АН СССР. 128 с.
- Шатуновский М. И. 1970. Изменение жирности органов и тканей беломорской речной камбалы в онтогенезе и по годам. В кн.: Биология Белого моря. М.: АН СССР. 3: 154—165.
- Юрлова Н. И., Водяницкая С. Н., Глухов В. В. 2000. Анализ взаимоотношений в системе паразит—хозяин (на примере моллюсков и трематод). Успехи современной биологии. 120 (6): 573—580.
- Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S. 2000. Immunobiology of the relationships of the echinostomes with snail intermediate hosts. In: *Echinostomes as experimental models for biological research*. Dordrecht, Boston, London. 149—173.
- Arduini A., Peschechera A., Dotori S., Sciarroni A. F., Serafini F., Calvani M. 1996. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitini and phospholipids in fatty acid turnover studies. *Journ. Lipid Research*. 37: 684—689.
- Ataev G. L., Coustau C. 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 187—198.
- Connors V. A. 2003. The schistosome-snail interaction: factors involved in host immunodefence activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata*. In: *Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites*. Perpignan: Presses Univ. de Perpignan. 1: 203—224.

- Connors V. A., Lodes M. J., Yoshino T. P. 1991. Identification of *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory—secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Journ. Invertebr. Pathol.* 58: 387—395.
- Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue. *Journ. Biol.Chem.* 226: 497—509.
- Engelbrecht F. M., Mori F., Anderson I. T. 1974. Cholesterol determination in serum. A rapid direct method. *S. A. Med. Journ.* 48: 250—256.
- Jourdane J., Cheng T. C. 1987. The two-phase recognition process of allografts in a brazilian strain of *Biomphalaria glabrata*. *Journ. Invertebr. Pathol.* 49: 145—158.
- Mazel P. 1972. Experiments Illustrating Drug Metabolism in Vitro. In: *Fundamental of Drug Metabolism and Drug Disposition*, Baltimore: The Williams et Wilkins Company. 27: 546—582.

THE EFFECT OF HELMINTH INVASION ON LIPID METABOLISM IN AMPHIPODA OF THE WHITE SEA

N. P. Tkach, R. U. Vysotskaya, E. S. Kertz

Key words: crustaceans, Gammaridae, helminthes, Trematoda, Cestoda, lipid metabolism.

S U M M A R Y

Comparative study of lipid metabolism parameters in amphipods (Gammaridae) of the White Sea infested by helminthes *Podocotyle atomon* (Trematoda), *Levinseniella propinqua* (Trematoda) and *Hymenolepis microsome* (Cestoda) during different seasons was performed. It is shown that increase in the parameters of infestation induced amplification of the defense reaction of host organism, which exhibited itself by the shift in the contents of the basic membranous lipids and by the increased activity of membrane-bound enzymes, such as cytochrome P-450, at the level of the biochemical parameters examined. Since autumn increased content of phosphatidylcholine and ratio phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine in crustacean lipid composition was recorded. The role of phosphatidylcholine in the change of liquid-crystal state of membranes and its role as an effector of peroxidase activity of cytochrome P-450 in the amphipods infested by helminthes are discussed.